

(様式 22)

26 年 3 月 10 日

学 位 論 文 の 内 容 の 要 約

氏 名	須賀 有子
学位の種類	博士（農学）
学府又は研究科・専攻	生物システム応用科学府 生物システム応用科学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	DGGE 法の土壌微生物生態研究への応用

【論文の内容の要約】

安全で高品質な農作物の持続的生産を行うためには、安定した地力の確保や連作障害等の克服が重要である。そのためには、土壌の性質、つまり化学性、物理性、生物性を把握し、適切な土壌管理を行う必要がある。土壌の生物性は、バイオマス、活性、群集構造（フロラ）から構成されるが、それぞれ関連し合っているため、この 3 つの観点から評価することが望ましい。しかし、バイオマス、活性に関する知見に比べて、群集構造に関する知見は少なく、栽培管理が農地土壌の微生物群集構造におよぼす影響について十分に明らかになっていない。そこで本研究は、微生物群集構造解析法として DGGE 法を用いて、連作や前作、有機物施用、拮抗細菌接種、土壌消毒といった様々な栽培管理が、農地土壌や栽培用培地の細菌および糸状菌の群集構造におよぼす影響を評価することを目的として行った。

第Ⅱ章 1 節では、植物根から迅速・簡便かつ安価に DNA を抽出する手法として、ガラスビーズで細胞破碎を行うビーズ法が適当であるか、またビーズ法で抽出された DNA が細菌の 16S rDNA の PCR-DGGE 解析による細菌群集構造解析に供試可能かどうかを検討した。また、ビーズ法と他の DNA 抽出法について、抽出 DNA 量や DGGE パターンの比較を行った。その結果、約 5 mm に切断した根を 0.1 g ビーズ法に供試することで、根に生息する細菌の DNA 抽出および DGGE パターンを得ることは十分に可能であった。ビーズ法と CTAB 法および DNA 抽出キットを用いて DNA 抽出を行ったところ、抽出 DNA 量はビーズ法を用いた場合が最も多く、DGGE パターンは DNA 抽出法による大きな違いは見られなかった。以上の結果から、ビーズ法が細菌群集構造解析のための植物根からの迅速かつ簡便な DNA 抽出法として適していると考えられた。

第Ⅱ章 2 節では、軽石培地を用いたトマトの養液栽培において青枯病発病試験を行い、トマト青枯病拮抗細菌やリジン、シュクロースの添加が、青枯病発病およびトマト根の細菌、糸状菌群集構造におよぼす影響を評価した。青枯病拮抗細菌とリジンやシュクロースの添加によって、トマトの生育や収量を低下させずに発病株率は低下し、発病株率が最も低かった拮抗細菌 K20 およびリジン添加区では、リジン添加によって新たな細菌種が増殖することがわかった。正準対応分析（CCA）によって、拮抗細菌 K20 およびリジン添加区に特徴的な DGGE バンドが見られたことから、これらのバンドに相当する細菌種が発病抑制に関与したと考えられた。細菌と同様にリジンやシュクロース添加区では新たな糸状菌種が増殖したが、CCA の結果からこれらの糸状菌種は発病抑制に関与しなかったと考えられ、拮抗細菌 K20 およびリジン添加区で見られた高い発病抑制効果におよぼす影響は、トマト根の糸状菌群集よりも細菌群集の方が大きいと考えられた。また、播種後 6 週のトマト根の青枯病菌 DNA 量が青枯病発病株率に相関することが示され、青枯病発病リスク評価に有用である可能性が示唆された。

第Ⅱ章 3 節では、トマトの前作作物として、トマト以外の 9 種類の作物を栽培した軽石培地を用いて青枯病発病試験を行い、前作作物の種類がトマトの青枯病発病および軽石培地の細菌群集構造におよぼす影響を評価した。前作作物の種類によって次作のトマト青枯病発病株率は異なり、特にネギ、ニラを栽培した軽石培地では発病株率が低かった。前作作物栽培後の軽石培地をクロ

ロホルム燻蒸処理したところ、燻蒸処理をしなかった場合に比べて発病株率が高かったため、この効果は主に培地の生物性によるものと推察された。一方で、ネギ、トウガラシを栽培した軽石培地については、培地の生物性だけでなく化学性等他の要因の影響も考えられた。

トマト青枯病発病株率と前作作物栽培後の軽石培地のトマト青枯病拮抗細菌数、CO₂発生量、抽出 DNA 量、細菌群集の多様性との間に相関関係は見られず、これらの発病抑制への関与は小さいと考えられた。発病程度が異なると軽石培地の細菌の DGGE パターンも異なる傾向が見られたことから、生物性のうち細菌群集構造の違いが発病抑制に影響し、発病程度の低かったネギ、ニラ栽培後の軽石培地中に存在する特定の細菌種がトマト青枯病発病抑制に関与した可能性が考えられた。

第Ⅲ章では、スギ皮培地を用いたユリのボックス栽培試験において、ユリの連作が土壤病害発生およびスギ皮培地の糸状菌の群集構造におよぼす影響を評価した。

2 種類のスギ皮培地を用いたユリの周年栽培（年 3 作）の現地実証試験において、ユリの連作がスギ皮培地の糸状菌群集や化学性におよぼす影響を調査した。スギ皮培地の糸状菌群集の DGGE パターンに基づくクラスター解析の結果、2 種類の培地の糸状菌群集は栽培期間を通して異なり、栽培の回数または時期よりも培地の種類が糸状菌群集の違いに最も影響したことがわかった。同じ種類の培地では、ユリの栽培回数の影響が見られ、灌水、施肥といった栽培管理によるスギ皮培地の化学性の変化が、糸状菌群集の違いに影響したと DGGE パターンに影響したと考えられた。

5 種類のユリ病原糸状菌からなる DGGE マーカーを作製し、スギ皮培地の DGGE パターンにおけるマーカーと同位置のバンドの有無を評価することによって、スギ皮培地の潜在的な病害発生リスクの評価を試みた。その結果、スギ皮培地の DGGE パターンにこれらのバンドはほとんど見られず、また栽培期間を通して病害は発生しなかったことから、3 連作行ってもスギ皮培地の病害発生リスクは小さいと考えられた。また、小規模連作試験の結果から、7 連作行ってもスギ皮培地の病害発生リスクは小さく、必ずしも 3 連作後にスギ皮培地の更新を行う必要がないことが示唆された。

第Ⅳ章では、土壤生物性を考慮した有機質資材施用法開発のための基礎的な知見を得ることを目的として、堆肥とワラ類の組み合わせ施用が土壤生物性におよぼす影響を評価した。

豚ふん堆肥、イナワラまたはムギワラ、化成肥料の組み合わせ施用試験を行い、土壤微生物のバイオマス、呼吸量、細菌群集の多様性を調査した。その結果、化成肥料単用に比べて、化成肥料に堆肥またはワラを併用することによって、バイオマス、呼吸量、細菌および糸状菌群集の多様性が高まることがわかった。堆肥およびワラを併用すると、さらに高まることがわかった。また、他の組み合わせ試験として、牛ふん堆肥、イナワラ、化成肥料の組み合わせ試験を行い、細菌および糸状菌群集の多様性、バイオマスの指標として抽出 DNA 量を調査した。その結果、細菌および糸状菌群集ともに化成肥料単用区に比べて、牛ふん堆肥＋イナワラ区、イナワラ＋化成肥料区、牛ふん堆肥＋イナワラ＋化成肥料区で多様性が高かった。また、DNA 量は堆肥を施用した処理区で高く、化成肥料やワラより堆肥の施用が微生物群集の多様性、バイオマスの増加におよぼす影響が大きいと考えられた。

牛ふん堆肥とイナワラの組み合わせ施用試験で得られた微生物群集の多様性の異なる土壌を用いて、ハウレンソウ萎凋病、また株腐病発病試験を行い、微生物群集の多様性と発病の関係を調査した。その結果、萎凋病発病試験では、多様性が高かった堆肥、ワラ、化成肥料併用区では、多様性の低かった堆肥、化成肥料併用区に比べて、有意に発病株率が低かった。また、株腐病発病試験においても同様の傾向が見られ、微生物群集の多様性がハウレンソウ土壤病害の発生に影響した可能性が示唆された。

第Ⅴ章では、雨よけハウスでのハウレンソウのプランタ栽培において、ハウレンソウ萎凋病発病試験を行い、カラシナを用いた土壤還元消毒および消毒後のハウレンソウの連作が、萎凋病発病および土壌の糸状菌群集におよぼす影響を評価した。

カラシナを用いた土壤還元消毒を 6 月に約 1 ヶ月間行うことによって、夏季のハウレンソウ栽培において高い萎凋病発病抑制効果が見られた。その効果は、萎凋病菌密度が高い土壌（10³ cfu

g⁻¹ 乾土相当) においても認められ、またフスマを用いた場合と同程度だった。この発病抑制効果には、地温の上昇よりカラシナ鋤き込みによる土壌の還元化が大きく影響したと考えられた。

土壌糸状菌群集は土壌還元消毒処理によって変動し、フスマ、カラシナ、エンバクといった用いる有機物の種類が、萎凋病菌接種量やハウレンソウ栽培回数よりも糸状菌群集の変動に影響することがわかった。カラシナを用いた土壌還元消毒によるハウレンソウ萎凋病発病抑制効果の持続性について、2年間の土壌還元消毒およびハウレンソウ連作試験の結果から、6月に約1ヶ月間の土壌還元消毒を行った場合、その発病抑制効果は翌年の夏作まで持続せず、萎凋病が多発する夏作前に再度消毒処理を行う必要があると考えられた。また、萎凋病菌密度が高い場合、低い場合に比べて6月の土壌還元消毒による発病抑制効果は低く、処理を7~8月の盛夏期に行うことによって、萎凋病菌密度を一度大きく下げる必要があると考えられた。

以上のように、DGGE法を用いて農地土壌や栽培用培地の微生物群集構造解析を行い、様々な栽培管理が細菌や糸状菌の群集構造の変動に影響することを明らかにした。また、特定の微生物種や微生物群集の多様性が土壌病害発生に関与した可能性を示した。本研究を通して、DGGE法は農地土壌や栽培用培地の一般的な微生物群集構造解析法として適用可能であり、栽培管理による微生物群集構造の変動を評価するのに適していると考えられた。